

辅酶 I NAD (H) 含量检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA1099

产品规格: 50管/24样

产品简介:

辅酶I包括还原型和氧化型两种形式,在生物氧化中起传递氢的作用。氧化型辅酶I又称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)是脱氢酶的辅酶,它在糖酵解、糖异生、三羧酸循环和呼吸链中发挥着不可替代的作用。中间产物会将脱下的氢递给NAD,使之成为NADH(还原型辅酶I)。而NADH则会作为氢的载体,在呼吸链中通过化学渗透偶联的方式,合成ATP。NAD(H)在机体内有重要的生理意义,与物质代谢、能量代谢、抗细胞衰老、抗氧化以及一些疾病的发生密切相关。体内辅酶I含量降低会导致细胞损伤或衰老。

分别用酸性和碱性提取液提取样品中NAD⁺和NADH,NADH通过PMS的递氢作用,还原氧化型噻唑蓝(MTT)为甲瓖,在570nm下检测吸光值,NAD⁺可被乙醇脱氢酶还原为NADH,进一步采用MTT还原法检测。

注意:实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

| 产品名称 | 规格 | 保存条件 |
|---------|--------------|------|
| 酸性提取液 | 液体15mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 碱性提取液 | 液体15mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂一 | 液体20mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 液体6mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂三 | 粉剂×1瓶 | -20℃ |
| 试剂四 | 粉剂×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂五 | 液体3mL×1瓶 | -20℃ |
| 试剂六 | 液体40mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂七 | 液体5mL×1瓶(自备) | 室温 |
| NAD标准品 | 粉剂×1支 | -20℃ |
| NADH标准品 | 粉剂×1支 | -20℃ |

溶液的配制:

1. 试剂三:临用前加入6.1mL蒸馏水充分溶解,4℃保存一周;
2. 试剂四:临用前加入6.6mL蒸馏水充分溶解,4℃保存一周;
3. 试剂七:72mL乙醇和3mL蒸馏水混合,备用;
4. NAD标准品:临用前加入1.5mL蒸馏水,即2 μ mol/mL,将其稀释为1.25nmol/mL的NAD标准溶液备用;
5. NADH标准品:临用前加入1.4mL蒸馏水,即2 μ mol/mL,将其稀释为1.25nmol/mL的NADH标准溶液备用。

自备材料:

可见分光光度计、台式离心机、移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤 (仅供参考):

一、NAD⁺和NADH的提取(可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

1. 血清（浆）中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：取0.1mL血清（浆），加入0.5mL酸性提取液，煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心10min；取上清200μL，加入等体积碱性提取液；混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，冰上保存待测。

NADH的提取：取0.1mL血清（浆），加入0.5mL碱性提取液，煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清200μL，加入等体积酸性提取液；混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，冰上保存待测。

2. 组织中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：称取约0.1g组织，加入0.5mL酸性提取液，冰浴研磨，煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清200μL，加入等体积碱性提取液混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，冰上保存待测。

NADH的提取：称取约0.1g组织，加入0.5mL碱性提取液，冰浴研磨，煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清200μL，加入等体积酸性提取液混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，冰上保存待测。

3. 细胞或细菌中NAD⁺和NADH的提取：

NAD⁺的提取：收集500万细胞或细菌，加入0.5mL酸性提取液，超声波破碎1min（强度20%或200W，超声2s，停1s），煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液200μL至另一新的离心管中，加入等体积的碱性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，冰上保存待测。

NADH的提取：收集500万细胞或细菌，加入0.5mL碱性提取液，超声波破碎1min（强度20%或200W，超声2s，停1s），煮沸5min（盖紧，以防止水分散失），冰浴中冷却后，10000g 4℃离心10min，取上清液200μL至另一新的离心管中，加入等体积的酸性提取液使之中和，混匀，10000g 4℃离心10min，取上清，冰上保存待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热30分钟以上，调节波长至570nm，蒸馏水调零。

2. 操作表（在1.5mL棕色EP管中按下表依次加样）

| 试剂名称 | 对照管(μL) | 测定管(μL) | NAD或NADH标准管(μL) | 空白管(μL) |
|---|---------|---------|-----------------|---------|
| 上清液 | 50 | 50 | - | - |
| 标准溶液 | - | - | 50 | - |
| 蒸馏水 | - | - | - | 50 |
| 试剂六 | 500 | - | - | - |
| 试剂一 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| 试剂二 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| 试剂三 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| 试剂四 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| 试剂五 | 35 | 35 | 35 | 35 |
| 充分混匀，室温避光静置20min | | | | |
| 试剂六 | - | 500 | 500 | 500 |
| 充分混匀，静置5min后，15000rpm，25℃离心15min，弃上清，沉淀中加入： | | | | |
| 试剂七 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |

混匀，570nm下比色，读取吸光值ΔA测定=A测定管-A对照管，NAD标准管的记为ΔA标准1=A标准管1-A空白管。NADH标准管的记为ΔA标准2=A标准管2-A空白管。（空白管只需做1-2次）

三、NAD⁺含量的计算

1. 血清（浆）中NAD⁺含量计算



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

NAD^+ 含量(nmol/mL) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准1 \div C标) \times V提取 \div V血清 = $12.5 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准1

2. 组织、细菌、细胞中 NAD^+ 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

NAD^+ (nmol/mg prot) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准1 \div C标) \times V提取 \div (V提取 \times Cpr) = $1.25 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准1 \div Cpr

(2) 按样本质量计算

NAD^+ (nmol/g 质量) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准1 \div C标) \times V提取 \div W = $1.25 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准1 \div W

(3) 按细菌或细胞数量计算

NAD^+ (nmol/ 10^4 cell) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准1 \div C标) \times V提取 \div 500 = $0.0025 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准1

四、 NADH 含量的计算

1. 血清(浆)中 NADH 含量计算

NADH 含量(nmol/mL) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准2 \div C标) \times V提取 \div V血清 = $12.5 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准2

2. 组织中 NADH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

NADH (nmol/mg prot) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准2 \div C标) \times V提取 \div (V样品 \times Cpr) = $1.25 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准2 \div Cpr

(2) 按样本质量计算

NADH (nmol/g 质量) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准2 \div C标) \times V提取 \div W = $1.25 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准2 \div W

(3) 按细菌或细胞数量计算

NADH (nmol/ 10^4 cell) = ΔA 测定 \div (ΔA 标准2 \div C标) \times V提取 \div 500 = $0.0025 \times \Delta\text{A}$ 测定 \div ΔA 标准2

C标: NAD 或 NADH 标准溶液的浓度, 1.25nmol/mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; V提取: 加入提取液总体积, 1mL; V血清: 提取时加入的血清体积, 0.1mL; W: 样本质量, g; 500: 500万个细胞。

注意事项:

1. 操作过程应避光。不可将试剂一、二、三和四混合后再加, 必须分开加。
2. 反应过程要注意避光。
3. 当吸光值大于1时, 建议稀释后测量, 计算公式中应当乘以稀释倍数。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>